

**MAIL STOP PATENT APPLICATION**  
Attorney Docket No. 26099

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re Application of:

SAN GABRIEL, et al.

Serial No.: Not yet assigned

Filed: April 21, 2004

Title: **NOVEL GLUTAMIC ACID RECEPTOR AND UTILIZATION THEREOF**

(Continuation of International Application No. PCT/JP02/10984,  
having an International Filing Date of October 23, 2002.)

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. §119**

Commissioner of Patents  
Alexandria, Virginia 22313-1450

Sir:

In the matter of the above-captioned application, notice is hereby given that the Applicant claims as priority date October 23, 2001, the filing date of the corresponding application filed in JAPAN, bearing Application Number 2001-325159.

A Certified Copy of the corresponding application is submitted herewith.

Respectfully submitted,  
**NATH & ASSOCIATES PLLC**

Date: April 21, 2004

By: 

Gary M. Nath  
Registration No. 26,965  
Todd L. Juneau  
Registration No. 40,669  
Customer No. 20529

**NATH & ASSOCIATES PLLC**  
6<sup>TH</sup> Floor  
1030 15<sup>th</sup> Street, N.W.  
Washington, D.C. 20005  
(202)-775-8383  
GMN/TLJ/lis:Priority.req



日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 1 年 1 0 月 2 3 日  
Date of Application:

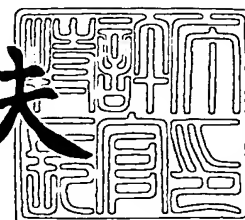
出 願 番 号                      特 願 2 0 0 1 - 3 2 5 1 5 9  
Application Number:  
[ST. 10/C] :                      [ J P 2 0 0 1 - 3 2 5 1 5 9 ]

出      願      人                      味の素株式会社  
Applicant(s):

2 0 0 4 年    3 月    4 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫





【書類名】 特許願

【整理番号】 P-9163

【提出日】 平成13年10月23日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07K 14/705

【発明の名称】 新規グルタミン酸受容体とその利用

【請求項の数】 16

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社中央  
                                研究所内

    【氏名】 アナ サン ガブリエル

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社中央  
                                研究所内

    【氏名】 前川 誉実

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社中央  
                                研究所内

    【氏名】 畝山 寿之

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社中央  
                                研究所内

    【氏名】 鳥居 邦夫

【特許出願人】

    【識別番号】 000000066

    【氏名又は名称】 味の素株式会社

**【代理人】****【識別番号】** 100089244**【弁理士】****【氏名又は名称】** 遠山 勉**【選任した代理人】****【識別番号】** 100090516**【弁理士】****【氏名又は名称】** 松倉 秀実**【選任した代理人】****【識別番号】** 100100549**【弁理士】****【氏名又は名称】** 川口 嘉之**【連絡先】** 0 3 - 3 6 6 9 - 6 5 7 1**【手数料の表示】****【予納台帳番号】** 012092**【納付金額】** 21,000円**【提出物件の目録】****【物件名】** 明細書 1**【物件名】** 図面 1**【物件名】** 要約書 1**【プルーフの要否】** 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規グルタミン酸受容体とその利用

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記性質を有するグルタミン酸受容体タンパク質:

(A) タイプ 4 型代謝型グルタミン酸受容体タンパク質と共通の膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインを有する、

(B) タイプ 4 型代謝型グルタミン酸受容体タンパク質よりも約 316 又は 327 アミノ酸残基短い細胞外ドメインを有する、

【請求項 2】 ラットの小腸及び大腸において発現していることを特徴とする請求項 1 記載のグルタミン酸受容体タンパク質。

【請求項 3】 配列番号 7 に示すアミノ酸配列又は同アミノ酸配列においてアミノ酸番号 12～584 で表されるアミノ酸配列を有する請求項 1 記載のグルタミン酸受容体タンパク質。

【請求項 4】 1 又は複数のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は付加を含み、かつ、グルタミン酸が結合することによってセカンドメッセンジャーを発生し得る請求項 3 記載のグルタミン酸受容体タンパク質。

【請求項 5】 請求項 1～4 のいずれか一項に記載のグルタミン酸受容体タンパク質をコードし、かつ、タイプ 4 型代謝型グルタミン酸受容体タンパク質を発現しない DNA。

【請求項 6】 請求項 1～4 のいずれか一項に記載のグルタミン酸受容体タンパク質をコードする DNA を発現可能な形態で保持する細胞。

【請求項 7】 請求項 1～4 のいずれか一項に記載のグルタミン酸受容体タンパク質をコードする DNA を発現可能な形態で保持する細胞を培地で培養し、同グルタミン酸受容体タンパク質を生成させることを特徴とする、グルタミン酸受容体タンパク質又はそれを保持する細胞の製造法。

【請求項 8】 請求項 1～4 のいずれか一項に記載のグルタミン酸受容体タンパク質と同タンパク質に結合する物質とを被検物質の存在下で反応させ、該反応の阻害又は促進を検出することを特徴とする、グルタミン酸のアゴニストもしくはアンタゴニスト又はアロステリックモジュレーターの探索方法。

【請求項 9】 請求項 1～4 のいずれか一項に記載のグルタミン酸受容体タンパク質と被検物質とを反応させ、該反応を検出することを特徴とする、グルタミン酸のアゴニストの探索方法。

【請求項 10】 前記グルタミン酸受容体タンパク質を、請求項 6 記載の細胞又は同細胞から調製される膜画分を用いる請求項 8 記載の方法。

【請求項 11】 前記結合の阻害又は促進を、グルタミン酸受容体タンパク質が発生するセカンドメッセンジャーにより検出する請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】 前記グルタミン酸受容体タンパク質を、請求項 6 記載の細胞又は同細胞から調製される膜画分を用いる請求項 9 記載の方法。

【請求項 13】 前記結合の阻害又は促進を、グルタミン酸受容体タンパク質が発生するセカンドメッセンジャーにより検出する請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】 請求項 1～4 のいずれか一項に記載のグルタミン酸受容体タンパク質に特異的に結合する抗体。

【請求項 15】 請求項 1～4 のいずれか一項に記載のグルタミン酸受容体タンパク質と同タンパク質に結合する物質とを被検物質の存在下で反応させ、該反応の阻害又は促進を検出することにより、グルタミン酸のアゴニストもしくはアンタゴニスト又はアロステリックモジュレーターを探索する工程と、

前記ステップにより得られるグルタミン酸のアゴニストもしくはアンタゴニスト又はアロステリックモジュレーターを有効成分として医薬組成物を調製する工程を含む、

グルタミン酸受容体にグルタミン酸が結合することにより発生するセカンドメッセンジャーを調節するための医薬の製造方法。

【請求項 16】 請求項 1～4 のいずれか一項に記載のグルタミン酸受容体タンパク質と被検物質とを反応させ、該反応を検出することにより、グルタミン酸のアゴニストを探索する工程と、

前記ステップにより得られるグルタミン酸のアゴニストを有効成分として医薬組成物を調製する工程を含む、

グルタミン酸受容体にグルタミン酸が結合することにより発生するセカンドメッセンジャーを調節するための医薬の製造方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、新規グルタミン酸受容体とその利用に関し、詳しくは、グルタミン酸受容体とそれをコードするDNA、ならびにそれらを利用して同受容体に結合するリガンドをスクリーニングする方法、及び受容体結合試験等に関する。

**【0002】****【従来の技術】**

グルタミン酸は、中枢神経系において主要な興奮性神経伝達物質であり、その制御異常は、記憶障害、虚血性脳障害、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン氏病、及びハンチントン舞蹈病等の進行性脳障害などの病態形成に寄与していると広く考えられている（Meldrum, B.S., Neurology, 1994 Nov;44 (11 Suppl 8):S14-23; Nishizawa, Y., Life Sci. 2001, Jun 15;69(4):369-81）。そのため、グルタミン酸受容体に関する多くの研究が脳神経系を通じてこれまでなされ、多くの受容体（イオン型受容体3種類、代謝型受容体8種類）が中枢神経系で発見され、上記疾患に対する治療薬の開発を目指して、今日もその受容体特異的な作用薬の開発が精力的になされている（詳しくはBarnard, E.A., Trends Pharmacol. Sci., 1997, May;18(5):141-8; Schoepp, D.D., Conn, P.J., Trends Pharmacol. Sci. 1993 Jan;14(1):13-20を参照）。

**【0003】**

一方、中枢神経系以外でのグルタミン酸受容体に関する研究は少ない。グルタミン酸は、体内のエネルギー源、不要となったアンモニアのトラップ源としての役割も兼ねており、血漿中に常に数十マイクロモルオーダー以上存在することが知られている。中枢神経系においては、血液脳関門の存在により、細胞外グルタミン酸濃度はナノモル以下である。そのため、上記中枢神経系で発見されたグルタミン酸受容体のグルタミン酸に対する親和性は、ナノモルオーダーからマイクロモルオーダーであり、グルタミン酸が神経終末より放出された時にのみ、作用することができる。尚且つ、グルタミン酸受容体は不活性化あるいはタキフィラキシーを起こしやすいため、中枢神経系においてはグリア細胞が特異的トランス

ポーターを介して常にグルタミン酸を取りこんで、細胞外濃度を下げている。一方、血液脳関門で守られない中枢神経系以外の場所では、仮にそのようなグルタミン酸受容体が発現していても、常にグルタミン酸受容体が刺激されている状態となり、実際には不活化されており機能していないものと考えられていた。

#### 【 0 0 0 4 】

しかし、2 0 0 1 年、Chaudhari, N., Landin, A.M., Roper, S.D.らは、ラット味蕾細胞から、うま味受容体として低親和性グルタミン酸受容体を発見した (Nat. Neurosci. 2000, Feb;3(2):113-9)。このうま味受容体は、ラット脳型代謝型グルタミン酸受容体のサブタイプであるタイプ 4 型 (mGluR4) (Tanabe, Y. et al., Neuron, 1992, Jan;8(1):169-79; Flor, P.J. et al., Neuropharmacology, 1995, Feb;34(2):149-55) とホスト遺伝子を同じとし、スプライシング変異により、脳型mGluR4の細胞外ドメインを一部欠損した味蕾型mGluR4であった。

#### 【 0 0 0 5 】

今日我々は、末梢性グルタミン酸受容体の生理機能を示唆する幾つかの知見を有している (Berk, M., Plein, H., Ferreira, D., Clin. Neuropharmacol., 2001, May-Jun;24(3):129-32; Karim, F., J. Neurosci. 2001, Jun 1;21(11):3771-9; Berk, M., Plein, H., Belsham, B., Life Sci. 2000;66(25):2427-32; Carlton, S.M., Coggeshall, R.E., Brain Res. 1999, Feb 27;820(1-2):63-70; Haxhiu, M.A., Erokwu, B., Dreshaj, I.A., J. Auton. Nerv. Syst. 1997, Dec 11;67(3):192-9; Inagaki, N., FASEB J. 1995, May;9(8):686-91; Erdo, S.L., Trends Pharmacol. Sci., 1991, Nov;12(11):426-9; Aas, P., Tanso, R., Fonnum, F., Eur. J. Pharmacol. 1989, May 2;164(1):93-102; Said, S.I., Dey, R.D., Dickman, K., Trends Pharmacol. Sci. 2001, Jul;22(7):344-5; Skerry, T.M., Genever, P.G., Trends Pharmacol. Sci. 2001, Apr;22(4):174-81)。

#### 【 0 0 0 6 】

ところで、ヒトを含めた哺乳動物が正常に成長 (growth) し、正常な生活 (健康) を維持するためには、必要な時期に必要な量の栄養素を経口より摂取し、不必要なものは排泄する必要がある。それを実際に行っているのが、口腔、胃、小腸、大腸からなる一本の管である消化管であり、消化吸收プロセスは腸管内在神



経叢と外在脳神経系により管理されている。必要な栄養素の摂取判断は、意識に上る経路（味覚）と、意識に上らない自律的な経路（内臓感覚）の脳内における統合により行われる。塩味（ナトリウム、カリウムなど）はミネラルのマーカールとして体液浸透圧の保持等に、甘味（グルコース）は炭水化物のマーカールとしてエネルギー補給に、うま味（グルタミン酸ナトリウム）はタンパク質源のマーカールとしてエネルギー・体蛋白補給、苦味は有害物質のマーカールとしての意味があると考えられている。即ち、味を頼りに、必要な栄養素は摂取される。そして、必要量を十分摂取したかどうかは、胃および小腸、及び肝臓－門脈系に存在する栄養素センサーを介して迷走神経求心路を活性化し、延髄孤束核へ入力され一連の脳内プロセスを得ることによって、満足感（satiety）として判断される（Bray, G.A., Proc. Nutr. Soc., 2000;59:373-84; Bray, G.A., Med. Clin. North. Am. 1989;73:29）。そして、迷走神経遠心路を通じて、消化吸收調節（消化酵素分泌、消化管運動など）が行われると考えられているが、その詳細なメカニズムは不明である。そして、最終的に満足感が得られると、摂食行動は終了する。万が一、生体にとって有害なもの（毒物）を摂取した場合は、液性および神経性応答を介して、嘔吐、下痢により体外へ排出すると考えられているが、その場合も不明な点が多い。

#### 【 0 0 0 7 】

一方、消化管における栄養素認識（chemical sense）機構に関する生理学的検討は古くから行われており、消化管内には内容物を知覚するセンサーが存在すると想定されている（詳しくは、Mei, N., J. Auton. Nerv. Syst., 1983;9:199-206; Mei, N., Lucchini, S., J. Auton. Nerv. Syst., 1992;41:15-8を参照）。これら消化管センサーとしては、グルコースセンサー（Mei, N., J. Physiol. (Lond.) 1978, 282, 485-506）、温度センサー（El Ouazzani, T., Mei, N., Exp. Brain Res. 1979 ;15;34:419-34）、浸透圧センサー（Mei, N., Garnier, L., J. Auton. Nerv. Syst., 1986;16:159-70）、pHセンサー、アミノ酸センサー（Mei, N., Physiol. Rev., 1985;65:211-37）、圧センサー（Barber, W.D., Burks, T.F., Gastroenterol Clin. North. Am. 1987;16:521-4）が挙げられる。

#### 【 0 0 0 8 】

特に、グルタミン酸を認識するセンサーとしては、新島らが、主として胃、小腸を支配している迷走神経胃枝及び腹腔枝の神経活動を電氣的に捉える手法を用いて、グルタミン酸の消化管内投与時に神経興奮が起こることを見出し、迷走神経終末にグルタミン酸認識機構が存在すると仮定し、グルタミン酸センサーとしてその存在を示唆した (Niiijima, A., *Physiol. Behav.*, 1991;49:1025-8)。

#### 【0009】

##### 【発明が解決しようとする課題】

上述のように、グルタミン酸受容体及び消化管センサーについて多くの研究がなされているが、今日まで、グルタミン酸センサーの実体は不明であり、研究の進展は見られていない。グルタミン酸センサーを含んだ消化管粘膜上における栄養素認識に必要な受容機構（受容体、トランスポーター等）が単離されていないことが、この分野の研究の進展を妨げている。本発明者らは、グルタミン酸消化管センサーの実体が解明されれば、下記に挙げる栄養素認識機構の調節を目的とした薬剤等の開発が可能であると考えた。

#### 【0010】

即ち、栄養素認識機構は、満足感 (satiety) あるいは飽きにも重要な役割を果たし、過食による体調不全、および偏食による摂取栄養素の偏りを是正する。この消化管における栄養素認識が正常に行われなくなると、当然ながら、消化吸収の全体のプロセスが乱れ、過食、偏食、食欲不振、消化不良、下痢、便秘等が引き起こされることが考えられる。より医学的には、心因性過食症、拒食症及び肥満症、胃酸分泌異常、消化管血流異常、消化酵素分泌異常等による消化性潰瘍（胃潰瘍、十二指腸潰瘍）、ストレス性潰瘍、薬物性（NSAIDs等）急性潰瘍、虚血性潰瘍（虚血性大腸炎）、インシュリン分泌異常又は消化管ホルモン分泌異常による糖尿病、運動性機能異常による胃もたれ、むかつき、便秘、下痢、過敏性腸症候群などの要因として考えられる。

#### 【0011】

また、近年、肥満者の急増は社会現象化し、問題となっている。これらの人は基礎代謝が低下した人が多く、また過食傾向にあると言われ、これらの人の食べたいという欲求を如何にコントロールするかは社会的関心が非常に大きい。無理

なダイエットを試みる人も多いが、多くの場合、失敗に終わっている。消化管における栄養素認識機構を是正し、食事による満足感を如何に正常に得るかは、これらの人にとっても非常に重要である。

#### 【0012】

本発明は、上記観点からなされたものであり、消化管グルタミン酸センサーの実体を明らかにし、それを利用した技術を提供することを課題とする。

#### 【0013】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、代謝型グルタミン酸受容体（1型及び4型）の細胞内ドメインを認識する抗体を用いた免疫組織学的手法により、消化管内における受容体分布を検討した。その結果、胃内粘膜層には代謝型グルタミン酸1型受容体（GluR1）陽性細胞が存在し、小腸・大腸粘膜層には代謝型グルタミン酸4型受容体（GluR4）陽性細胞が存在することを見出した。胃では、胃体部の粘液分泌細胞（副細胞）及びペプシノーゲン分泌細胞（主細胞）、並びに幽門部の粘液細胞がmGluR1陽性であり、小腸・大腸では粘液産生細胞（杯細胞：goblet cell）がmGluR4陽性であった。そして、小腸・大腸サンプルから新規なグルタミン酸受容体と思われるcDNAをクローニングすることに成功した。このグルタミン酸受容体は、これまで実態が不明であった、消化管グルタミン酸センサーである可能性が高く、本受容体cDNA、精製受容体及び本受容体発現細胞は、消化管グルタミン酸センサーの機能調節剤のスクリーニングに有用であると考えられる。

#### 【0014】

本発明は、上記知見に基づいてなされたものであり、その要旨は以下のとおりである。

（1）下記性質を有するグルタミン酸受容体タンパク質：

（A）タイプ4型代謝型グルタミン酸受容体タンパク質と共通の膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインを有する、

（B）タイプ4型代謝型グルタミン酸受容体タンパク質よりも約316又は327アミノ酸残基短い細胞外ドメインを有する、

（2）ラットの小腸及び大腸において発現していることを特徴とする（1）のグル

タミン酸受容体タンパク質。

(3) 配列番号 7 に示すアミノ酸配列又は同アミノ酸配列においてアミノ酸番号 12～584 で表されるアミノ酸配列を有する(1)のグルタミン酸受容体タンパク質。

(4) 1 又は複数のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は付加を含み、かつ、グルタミン酸が結合することによってセカンドメッセンジャーを発生し得る(3)のグルタミン酸受容体タンパク質。

(5) (1)～(4)のいずれかのグルタミン酸受容体タンパク質をコードし、かつ、タイプ 4 型代謝型グルタミン酸受容体タンパク質を発現しない DNA。

(6) (1)～(4)のいずれかのグルタミン酸受容体タンパク質をコードする DNA を発現可能な形態で保持する細胞。

(7) (1)～(4)のいずれかのグルタミン酸受容体タンパク質をコードする DNA を発現可能な形態で保持する細胞を培地で培養し、同グルタミン酸受容体タンパク質を生成させ、前記細胞より前記グルタミン酸受容体タンパク質を採取することを特徴とする、グルタミン酸受容体タンパク質の製造法。

(8) (1)～(4)のいずれか一項に記載のグルタミン酸受容体タンパク質と同タンパク質に結合する物質とを被検物質の存在下で反応させ、該反応の阻害又は促進を検出することを特徴とする、グルタミン酸のアゴニストもしくはアンタゴニスト又はアロステリックモジュレーターの探索方法。

(9) (1)～(4)のいずれかのグルタミン酸受容体タンパク質と被検物質とを反応させ、該反応を検出することを特徴とする、グルタミン酸のアゴニストの探索方法。

(10) 前記グルタミン酸受容体タンパク質を、(6)の細胞又は同細胞から調製される膜画分を用いる(8)の方法。

(11) 前記結合の阻害又は促進を、グルタミン酸受容体タンパク質が発生するセカンドメッセンジャーにより検出する(10)の方法。

(12) 前記グルタミン酸受容体タンパク質を、(6)の細胞又は同細胞から調製される膜画分を用いる(9)の方法。

(13) 前記結合の阻害又は促進を、グルタミン酸受容体タンパク質が発生する

セカンドメッセンジャーにより検出する(12)の方法。

(14) (1)～(4)のいずれかのグルタミン酸受容体タンパク質に特異的に結合する抗体。

(15) (1)～(4)のいずれかのグルタミン酸受容体タンパク質と同タンパク質に結合する物質とを被検物質の存在下で反応させ、該反応の阻害又は促進を検出することにより、グルタミン酸のアゴニストもしくはアンタゴニスト又はアロステリックモジュレーターを探索する工程と、

前記ステップにより得られるグルタミン酸のアゴニストもしくはアンタゴニスト又はアロステリックモジュレーターを有効成分として医薬組成物を調製する工程を含む、

グルタミン酸受容体にグルタミン酸が結合することにより発生するセカンドメッセンジャーを調節するための医薬の製造方法。

(16) (1)～(4)のいずれかのグルタミン酸受容体タンパク質と被検物質とを反応させ、該反応を検出することにより、グルタミン酸のアゴニストを探索する工程と、

前記ステップにより得られるグルタミン酸のアゴニストを有効成分として医薬組成物を調製する工程を含む、

グルタミン酸受容体にグルタミン酸が結合することにより発生するセカンドメッセンジャーを調節するための医薬の製造方法。

## 【0015】

### 【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のグルタミン酸受容体タンパク質は、典型的には、配列表の配列番号7のアミノ酸配列においてアミノ酸番号12～584で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質である。本タンパク質をコードするラットcDNAの塩基配列のオープンリーディング領域を配列番号6に示す。この配列の5'末端領域には、開始コドンの可能性のあるメチオニンコドンが2個（塩基番号1～3、34～36）見出された。N末端側のメチオニンコドンが開始コドンである可能性が高いが、2番目のメチオニンコドンが開始コドンである可能性もある。いずれにして

も、配列番号 6 に示す塩基配列の上流に適当なプロモーターを連結し、適当な細胞で発現させれば、活性のあるグルタミン酸受容体を産生させることができる。

#### 【0016】

配列番号 7 のアミノ酸配列を、脳型代謝型グルタミン酸 4 型受容体 (mGluR4) と比較したところ、C 末端側 (配列番号 7 中、アミノ酸番号 1 5 ~ 5 8 4) は一致していたが、mGluR4 に比べて N 末端側は 3 0 0 アミノ酸残基以上短かった。後述するように、本発明のグルタミン酸受容体タンパク質は、mGluR4 と共通の遺伝子に由来するスプライシング変異体 (variant) であると考えられた。以下、本発明のグルタミン酸受容体タンパク質を、本明細書では mGluR4 変異体と呼ぶことがある。

#### 【0017】

図 1 に、mGluR4 及び mGluR4 変異体の構造を示す。mGluR4 は、細胞内ドメインと、7 つの膜貫通ドメインと、細胞外ドメインからなっている。mGluR4 変異体も、mGluR4 と細胞内ドメインと 7 つの膜貫通ドメインを有しており、mGluR4 のそれらと同一の配列を有している。一方、細胞外ドメインは、mGluR4 変異体は 1 番目のメチオニンコドンが開始コドンであるとする 3 1 6 アミノ酸残基、2 番目のメチオニンコドンが開始コドンであるとする 3 2 7 アミノ酸残基、mGluR4 よりも短い。

#### 【0018】

すなわち、本発明の mGluR4 変異体は、タイプ 4 型代謝型グルタミン酸受容体タンパク質と共通の膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインを有し、タイプ 4 型代謝型グルタミン酸受容体タンパク質よりも約 3 1 6 又は 3 2 7 アミノ酸残基短い細胞外ドメインを有する。

#### 【0019】

前記 mGluR4 変異体をコードする cDNA 配列を、mGluR4 mRNA 配列 (O'Hara, et al., Neuron, 11: 41, 1993) と比較したところ、これらは共通の遺伝子に由来することが示唆された。すなわち、mGluR4 変異体の生成は、mGluR4 遺伝子中の第 2 のエクソンが選択的スプライシング (alternative splicing) により脱落し、フレームシフトが生じるため、第 1 エクソン中に終止コドンが出現し、さらにその

下流に新たに開始コドンが生じた結果であると推定される。

#### 【0020】

本発明のmGluR4変異体は、ラット由来のものでもよいし、グルタミン酸が結合することによってセカンドメッセンジャーを発生し得るという性質を持つ限り、ヒト、サル、マウス、イヌ、ウシ、ウサギといった哺乳類や鳥類、魚類その他いかなる動物由来のmGluR4変異体でもよい。mGluR4変異体を医薬組成物の成分として用いる場合には、哺乳類由来のものが好ましい。

#### 【0021】

本発明のmGluR4変異体は、配列番号7に示すアミノ酸配列又は同アミノ酸配列においてアミノ酸番号12～584で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質に加えて、グルタミン酸が結合することによってセカンドメッセンジャーを発生し得るという性質を持つ限り、配列番号7に示すアミノ酸配列において1若しくは複数の位置での1若しくは複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を有するものであってもよい。

#### 【0022】

ここで、「複数」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、配列番号7に示すアミノ酸配列との相同性が80%以上、好ましくは90%以上となるような数が挙げられる。より具体的には、2～115個、好ましくは、2～58個、より好ましくは2～30個である。

#### 【0023】

尚、本発明のグルタミン酸受容体は、精製又は単離された形態であってもよいが、活性を必要とする場合は、適当な細胞で発現され、同細胞の膜に局在化した形態、又は、mGluR4変異体が発現した細胞から調製される膜画分に含まれる形態であることが好ましい。したがって、本発明のグルタミン酸受容体には、このようなmGluR4変異体を発現している細胞又は同細胞から調製された膜画分も含まれる。

#### 【0024】

mGluR4変異体は、例えば、mGluR4変異体をコードするDNAを適当な宿主細胞に導入し、発現させることによって取得することができる。前記DNAとしては

、マウス等の哺乳類細胞の染色体から単離したmGluR4変異体をコードする遺伝子又はcDNAが挙げられる。尚、染色体遺伝子を用いる場合は、mGluR4変異体を生成させるように、転写後のスプライシング等のプロセスを調節する必要があると考えられるため、cDNAを用いることが好ましい。

#### 【0025】

mGluR4変異体cDNAは、ラット等の哺乳動物の小腸又は大腸から調製したRNAを鋳型とし、例えば配列番号1～5に示すオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、mGluR4変異体cDNAを増幅することによって、クローニングすることができる。また、本発明により、mGluR4変異体の構造、特にN末端領域の特徴的な構造が明らかになったので、それらの構造に基づいて、mGluR4変異体cDNAのクローニング及び同定は容易に行うことができる。こうして得られるmGluR4変異体cDNAのオープンリーディング領域塩基配列が、配列番号6に示した配列である。

#### 【0026】

mGluR4変異体をコードするDNAを導入する細胞としては、mGluR4変異体の活性を必要とする場合は、動物細胞、昆虫細胞又は酵母が好ましく、動物細胞が特に好ましい。例えば、mGluR4変異体をコードするDNAを含む組換えベクターを導入し、一時的な機能発現が可能と考えられる細胞として、アフリカツメガエル卵母細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）、baby hamster kidney（BHK）細胞、human embryonic kidney（HEK）細胞、Sf-9 insect細胞、PC12細胞、COC A-2細胞等が挙げられる。また、mGluR4変異体をコードするDNAを染色体DNAに組み込み、mGluR4変異体を永久的に発現させる場合には、上記の細胞のうち、アフリカツメガエル卵母細胞以外の細胞が挙げられる。

#### 【0027】

一方、mGluR4変異体を、mGluR4変異体に特異的に結合する抗体を作製するための免疫源として用いる場合のように、生理活性を必要としない場合には、mGluR4変異体をコードするDNAを導入する細胞は、mGluR4変異体を活性のある形態で発現しない細胞であってもよい。そのような細胞としては、エシェリヒア・コリをはじめとする異種蛋白質生産に通常用いられている微生物細胞を用いることができる。



## 【0028】

mGluR4変異体を宿主細胞中で産生させるためには、宿主細胞に適したプロモーターおよびエンハンサー等の発現調節配列に、mGluR4変異体をコードするDNAを連結する。また、mGluR4変異体をコードするDNAは、必要に応じて、プロセシング情報部位、例えばリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアダニル化部位、および転写ターミネーター配列を含んでいてもよい。好ましい発現制御配列は、免疫グロブリン遺伝子、SV40、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス、サイトメガロウイルス等に由来するプロモーターである。

## 【0029】

細胞へのDNAの導入等の操作に必要な技術は、Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)等に記載されている。

## 【0030】

上記のようにして得られるmGluR4変異体をコードするDNAを発現可能な形態で保持する細胞を培地で培養し、mGluR4変異体を生成させることにより、mGluR4変異体及びmGluR4変異体を保持する細胞を製造することができる。

## 【0031】

活性なmGluR4変異体、すなわちグルタミン酸が結合することによってセカンドメッセンジャーを発生し得るmGluR4変異体は、グルタミン酸のアゴニストもしくはアンタゴニスト又はアロステリックモジュレーターの探索等に利用することができる。例えば、mGluR4変異体と、mGluR4変異体に結合する物質とを被検物質の存在下で反応させ、該反応の阻害又は促進を検出することにより、グルタミン酸のアゴニストもしくはアンタゴニスト又はアロステリックモジュレーター（以下、これらを「リガンド」と総称することがある）を探索することができる。アロステリックモジュレーターは、mGluR4変異体とグルタミン酸との結合部位以外の部位に結合し、アゴニスト又はアンタゴニストと同様の機能を示す。

また、グルタミン酸のアゴニストは、mGluR4変異体と被検物質とを反応させ、該反応を検出することによっても、探索することができる。

## 【0032】

活性なmGluR4変異体としては、mGluR4変異体を発現している細胞、又は同細胞から調製される膜画分が挙げられる。このような膜画分は、例えば、上記のように細胞に活性なmGluR4変異体を発現させ、そして、細胞を超音波などで破碎後、密度勾配遠心法で膜分画を集めることにより調製することができる。

#### 【0033】

また、前記mGluR4変異体に結合する物質として、グルタミン酸もしくはグルタミン酸アゴニスト、又はmGluR4に結合する公知のリガンド（L-AP4、CPPG、MAP-4等）等が挙げられる。mGluR4変異体の活性を調節する物質としては、細胞内カルシウム濃度に影響を与える薬剤（カルシウムチャンネルおよびナトリウムチャンネルオープナー、Na/Kポンプ阻害剤、Na/Ca交換系作用剤、Ca-ATPase阻害剤、プロテインキナーゼC作用剤）、細胞内cAMP濃度に影響を与える薬剤（フォスフォジエステラーゼ作用剤、アデニレートシクラーゼ作用剤）、細胞内cGMP濃度に影響を与える薬剤（cGMP依存性フォスフォジエステラーゼ作用剤、グアニレートシクラーゼ作用剤）等が挙げられる。

#### 【0034】

mGluR4変異体と、これに結合する物質との反応の阻害又は促進は、mGluR4変異体にグルタミン酸等のリガンドが結合することによって発生するセカンドメッセンジャーを検出することによって、検出することができる。また、セカンドメッセンジャーを検出する代わりに、既知のリガンドを標識したものをを用い、標識リガンドとmGluR4変異体との結合を測定することによっても、前記反応の阻害又は促進を検出することができる。

また、mGluR4変異体とグルタミン酸のアゴニストとの反応は、mGluR4変異体とグルタミン酸のアゴニストとの結合により発生するセカンドメッセンジャーを検出することによって、検出することができる。

#### 【0035】

mGluR4変異体は、細胞内ドメインは脳型及び味蕾型mGluR4と同一であり、脳型及び味蕾型mGluR4の細胞内シグナル伝達機序は同じであるから、mGluR4変異体も同様であると予想される。したがって、前記セカンドメッセンジャーは、Gi (inhibitory GTP binding protein) を活性化しアデニレートシクラーゼを抑制する

ことに伴う、細胞内cAMP産生の抑制である。また、シグナル伝達におけるcAMPの下流には、cAMP-responsive element調節を介した遺伝子発現調節によるものと、細胞質・膜蛋白の磷酸化による急性期の機能調節がある。したがって、cAMPの細胞内蓄積量変化の計測、細胞内Ca-ATPase活性調節を介する細胞内カルシウム濃度変化の測定、チャンネル機能変化の測定等によって、セカンドメッセンジャーを検出することができる。

以下に、mGluR4変異体を用いたリガンド探索の具体的な方法を例示する。

#### 【 0 0 3 6 】

(1) アフリカツメガエル卵母細胞に、mGluR4変異体cRNAと、CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) cRNAを共発現させ、2電極ボルテジクランプ法により、CFTRに由来するクロライド電流の増強或いは減弱を指標に、mGluR4変異体に作用するリガンド検索を行う (Uezono et al., Receptors Channels 1993;1(3):233-41; Cunningham SA et al., Am. J. Physiol 1992 Mar;262(3 Pt 1):C783-8)。尚、CFTRは嚢胞性肺繊維症の疾患原因遺伝子産物であり、細胞内のcAMPにより活性が調節されるクロライドチャンネルである。

#### 【 0 0 3 7 】

(2) mGluR4変異体発現細胞とリガンド候補化合物とを一定期間共存させた後、発現細胞の細胞内cAMP量を用いて計測し、cAMPの増加または減少によりリガンド検索を行う (Chaudhari N, Nat Neurosci 2000 Feb;3(2):113-9; Flor PJ, Neuropharmacology 1995 Feb;34(2):149-55)。cAMP量は、市販のアッセイキットを用いて測定することができる。

#### 【 0 0 3 8 】

(3) mGluR4変異体発現細胞又は同細胞から調製した膜画分に、リガンド候補化合物、及びmGluR4に作用する既知のリガンド (例えばグルタミン酸、L-AP4、CPPG、MAP-4等) を一定期間作用させ、mGluR4変異体発現細胞の細胞膜又は膜画分に結合した既知リガンドの量を測定することにより、リガンド検索を行う (Naples MA, Neuropharmacology 2001;40(2):170-7; Thomsen C, Neuropharmacology 1997 Jan;36(1):21-30; H.I. Yamamura, S.J. Enna and M.J. Kuhar eds, 1958, Neurotransmitter Receptor Binding, 2nd ed., Raven Press, New Yor

k)。既知リガンドの量は、それらの物質の一部を放射活性ラベルし、細胞膜又は膜画分に結合する放射活性の量により、測定することができる。

【0 0 3 9】

(4) mGluR4変異体発現細胞に、あらかじめカルシウム感受性色素（例えばFura-2、Indo-1、Fluo-3等）を導入し、リガンド候補化合物とmGluR4変異体発現細胞を一定期間接触させたときの蛍光強度比（細胞内カルシウム濃度）変化を指標として、リガンド検索を行う。あるいは、mGluR4変異体アゴニストと、リガンド候補化合物と、カルシウム感受性色素を導入したmGluR4変異体発現細胞とを一定期間接触させたときの蛍光強度比（細胞内カルシウム濃度）変化により、リガンド検索を行う。

【0 0 4 0】

(5) mGluR4変異体発現細胞に、あらかじめcAMP感受性蛍光蛋白質（例えばFICR hR等）を導入し、リガンド候補化合物とmGluR4変異体発現細胞を一定期間接触させたときの蛍光強度比（細胞内cAMP濃度）変化を指標として、リガンド検索を行う（Adams SR, Nature 1991 Feb 21;349(6311):694-7）。

【0 0 4 1】

(6) リガンド候補化合物とmGluR4変異体発現細胞を一定期間接触させたとき、あるいは、mGluR4変異体作動薬とリガンド候補化合物とmGluR4変異体発現細胞を一定期間接触させたときのプロトン産生量をサイトセンサーにより測定し、プロトン産生量を指標としてリガンド検索を行う（McConnell HM, Science 1992 Sep 25;257(5078):1906-12）。

【0 0 4 2】

上記のようにして検索されるグルタミン酸のアゴニストもしくはアンタゴニスト又はアロステリックモジュレーターを有効成分として含む医薬組成物は、グルタミン酸受容体にグルタミン酸が結合することにより発生するセカンドメッセンジャーを調節するための医薬として使用することができる。セカンドメッセンジャーを調節することによって、グルタミン酸受容体異常に起因する疾患、病態を改善、予防することができる。

【0 0 4 3】

グルタミン酸受容体異常に起因する迷走神経制御異常としては、求心路異常（栄養素認識障害）と遠心路異常がある。求心路異常に起因する疾患又は病態としては、過食症、拒食症及び肥満症等が挙げられる。また、遠心路異常に起因するものとしては、胃酸分泌異常、消化管血流異常、消化酵素分泌異常等による消化性潰瘍（胃潰瘍、十二指腸潰瘍）、ストレス性潰瘍、薬物性（NSAIDs等）急性潰瘍、虚血性潰瘍（虚血性大腸炎）、インシュリン分泌異常又は消化管ホルモン分泌異常による糖尿病、過食症、拒食症、肥満症、及び、運動性機能異常による胃もたれ、むかつき、便秘、下痢、過敏性腸症候群などが挙げられる。

#### 【0044】

mGluR4変異体を免疫源として用いることにより、mGluR4変異体に特異的に結合する抗体を作製することができる。特に、mGluR4変異体はN末端が新規なアミノ酸配列を有しているので、この部分をエピトープとする抗体、特にモノクローナル抗体は、mGluR4変異体に結合し、他のグルタミン酸受容体には結合しないと予想される。mGluR4変異体に特異的な抗体は、mGluR4変異体特異的な免疫染色等に用いることができる。

#### 【0045】

##### 【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

#### 【0046】

【実施例1】 ラット腸組織からの新規な代謝型グルタミン酸受容体 cDNA のクローニング

ウィスター(Wistar)ラット (CRJ) の小腸及び大腸試料由来の全RNAを鋳型として、superscript (Gibco-BRL社) 及びSMART (Switching Mechanism at 5' end of RNA Transcript) RACE (rapid amplification of cDNA ends) cDNA amplification kit (Clontech社) を用いて逆転写を行った。得られたcDNAを鋳型として、LA taq (TaKaRa) を用いた5'-RACE及びそれに続くnested PCRによって、ラットmGluR4の5'末端フラグメントを増幅した。

#### 【0047】

遺伝子特異的プライマー (R-mGluR4: 5'-GAA GTT GAC GTT CCT GAT GTA CT-3')

(配列番号1), R2-mGluR4: 5'-ACA GCG TCA ATC ACG AAC TGC AC-3' (配列番号2)) は、脳型mRNA配列 (O'Hara, et al., Neuron, 11:41, 1993) に基づいて合成した。

#### 【0048】

SMART-RACE kitからのプライマー (Universal primer mix: Long 5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA ACA ACG CAG AGT-3' (配列番号3), Short 5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3' (配列番号4), 及びNested universal primer: 5'-AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GT-3' (配列番号5)) は、5'-RACE PCRを行うために用いた。

#### 【0049】

約30ngのラットcDNAを、遺伝子特異的プライマーR-mGluR4及びUniversal primer mixを用いて、10 $\mu$ lの10 $\times$ LA PCR buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM dNTP mixture及び 0.25 unitsの La Taq酵素中で、増幅した。

#### 【0050】

PCRは、GeneAmp PCR system 9700を用いて、94℃ 20秒、50℃ 1分、及び 68℃ 3分を40サイクル行った後、68℃10分の伸長を行った。

得られた反応産物は、R2-mGluR4及びNested universal primerを用いて、上記と同じ条件で再度増幅し、300bpの断片が得られた。

#### 【0051】

増幅産物は、アガロース電気泳動によって分離し、TA cloning kit (Invitrogen社)を用いて、二重プロモーター (Dual Promoter) を持つpCR-II vectorにクローニングした。

#### 【0052】

上記フラグメントについて、ABI Sequencer Model 3700 (ABI社) を用いて塩基配列を解析したところ、大腸から010411-70及び010411-66、010528-3、小腸から 010528-37と名付けられたクローンが同定された。これらは同一の塩基配列を含んでいた。

#### 【0053】

上記各クローンから決定された塩基配列を、配列番号6に示す。また、この塩

基配列に含まれるオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列を配列番号 7 に示す。この塩基配列を脳の mGluR4 mRNA 配列 (O'Hara, et al., Neuron, 11: 41, 1993) と比較したところ、配列番号 6 の塩基配列では、1724 位のシトシンは 1880 位のアデニンに直接結合しており (塩基の位置は、mGluR4 mRNA を基準とする)、155bp のフラグメントが抜け落ちていた。1724 位のシトシンの上流領域におけるフレームシフトにより、1684 位又は 1717 位から始まる開始コドンによりコードされるメチオニンを N 末端とする新規なペプチド (配列番号 8) が翻訳され、このペプチドはグルタミン酸受容体の細胞外ドメインに位置する 343 位のグリシンに結合すると考えられた。残りの配列は、脳型受容体と同一の配列であった。尚、配列番号 6 及び配列番号 7 には、1684 位から始まるコドンを開始コドンとして示した。2 つのメチオニンコドンのいずれが開始コドンであるかは不明であるが、いずれにしても、オープンリーディングフレームと周辺配列を細胞に導入して発現させれば、生体中で発現している発現産物と同じ発現産物が得られると予想される。

#### 【0 0 5 4】

上記オープンリーディングフレームがコードするタンパク質は、配列番号 7 に示すアミノ酸配列の 1 番目のメチオニンが N 末端であるとした場合、分子量は約 88 kD である。N 末端の 14 アミノ酸は、mGluR4 mRNA によりコードされるアミノ酸配列には存在しない配列である。

#### 【0 0 5 5】

以上のことから、得られたクローンは、新規な細胞外ドメインを有する mGluR4 のスプライシング変異体 (variant) であることが示された。

#### 【0 0 5 6】

##### 【実施例 2】免疫染色手法によるグルタミン酸受容体局在の同定

##### < 1 > ラット小腸及び大腸の切片標本の作製

ラット (Wistar 系、雄、10~15 週齢) をエーテル麻酔下で心臓右心耳を切開して放血し、その後すぐ小腸および大腸を採材した。小腸は胃幽門より約 5 センチの部分、大腸は回盲開口部より約 7 センチ肛門側の部分を採材した。消化物が多量に腸内に残っている場合は、生理食塩水で腸管を洗浄した。

## 【0057】

切り出した腸管は切り開き、コルクボードに針で貼り付け、4%パラホルムアルデヒド（4℃）で一昼夜振蕩し、浸漬固定した。その後20% Sucrose-PBSに3～4日浸漬して凍結保護（Cryoprotection）した後、Tissue-Tek<sup>R</sup>（OCT compound）に包埋し、クリオスタットで5-7 $\mu$ mに薄切した。切片は室温にて乾燥させた後、各種染色に用いるまで4℃で保存した。

## 【0058】

## &lt;2&gt;抗代謝型グルタミン酸受容体抗体による免疫染色

切片の免疫染色は、Drengk, A.C. et al., J. Auto. Nerv. Sys. 78: 109-112, 2000、及びMiampamba, M. et al., J. Auto. Nerv. Sys. 77: 140-151, 1999に記載の方法に準じて行った。切片はまずPBSで洗浄した後、内因性ペルオキシダーゼによる反応を阻止するために、3%過酸化水素・メタノールで15分処理した。次に、切片をPBSで洗浄した後、10%正常馬血清を含む1%牛血清アルブミン添加PBS（1% BSA-PBS）を用いて1時間ブロッキングを行った。再びPBSで洗った後、1%正常馬血清を含む1% BSA-PBSで希釈した一次抗体（表1）を4℃で2晩反応させた。その後、切片をPBSで洗浄し、1% BSA-PBSで希釈した2次抗体（表1）を室温で1時間反応を行った。最後にVectorstain elite kit（Vector）を用いてABC（アビジン-ビオチン複合体）反応を行い、0.025%ジアミノベンチジン-0.25%塩化ニッケル-0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で発色させた。反応終了後、切片をPBSで洗い、エタノール・キシレンで脱水、封入の後、顕微鏡にて観察した。一次抗体を用いないものをネガティブコントロールとした。使用した一次抗体、二次抗体の種類及び希釈倍率を、表1に示す。

## 【0059】



【表 1】

表 1

一次抗体	一次抗体希釈倍率	二次抗体	一次抗体希釈倍率
anti-mGluR1a, rabbit, polyclonal, Chemicon, cat# AB1551	100	Biotinylated anti-rabbit Ig, Amersham Pharmacia Biotech, cat# RPN 1004	150
anti-mGluR2/3, rabbit, polyclonal, Chemicon, cat# AB1553	100	Biotinylated anti-rabbit Ig, Amersham Pharmacia Biotech, cat# RPN 1004	150
anti-mGluR4a, rabbit, Upstate Biotechnology, cat# 06-765	400	Biotinylated anti-rabbit Ig, Amersham Pharmacia Biotech, cat# RPN 1004	150
anti-mGluR5, rabbit, polyclonal, Chemicon, cat# AB5323	400	Biotinylated anti-rabbit Ig, Amersham Pharmacia Biotech, cat# RPN 1004	150

## 【0060】

## &lt; 3 &gt; アルシアンブルー・PAS染色

切片は流水で洗い、3%酢酸に親和させた後に、アルシアンブルー液（pH2.5、和光）で30～40分反応させた。次に流水で洗浄し、1%過ヨウ素酸溶液に10分間浸した後、シッフ試薬（Schiff's Reagent）（和光）で8～10分ほど反応させた。これによりムチンを染色し、腸管の杯細胞（goblet cell）を同定した。切片を再び流水で洗浄した後、最後にマイヤーのヘマトキシリン（Mayer's hematoxylin）（和光）で核染色し、色出しした後に、脱水・封入を行った。

## 【0061】

## &lt; 4 &gt; 結果

免疫染色の結果を図 2 に示す。小腸（図 2 A）および大腸（図 2 B）では抗mGluR4により杯細胞が染色された。杯細胞には、mGluR4受容体は発現していないと一般的に考えられている。したがって、mGluR4変異体は、杯細胞に発現していると考えられ、機能的には粘液分泌との関連が示唆された。

尚、上記と同様にして胃の切片標本の免疫染色を行ったところ、抗mGluR1抗体により、胃体部主細胞および副細胞、幽門部粘液分泌細胞が染色された。

#### 【0062】

##### 【実施例 3】新規mGluR4変異体の機能の推定

ラット（Wistar系、雄、8～10週齢：日本チャールズリバー）を18時間絶食後、ウレタン麻酔（1g/kg, i.p.）下に開腹し、実態顕微鏡下で迷走神経胃枝および腹腔枝を5mm前後剥離した。迷走神経束を切断後、小型オペ台（8×6mm）上に迷走神経束をのせて、周囲の脂肪及び結合組織を注意深く剥離し、その臓器側末端繊維を記録用のプラチナ製双極電極に載せ、流動パラフィン・ワセリン（1:1）混合液で周囲組織と絶縁した。また、MSG（L-グルタミン酸ナトリウム、味の素株式会社製）の投与ルートとして、経口で胃内および十二指腸起始部にシリコンチューブを留置した。

#### 【0063】

神経活動電位は、微小電位増幅器（WPI社製DAM-80）により10000倍に増幅し、ベッセルフィルター（4-pole, High Cut 10Hz, Low Cut 1KHz）によりノイズを低減させた後、A/D変換（Powerlab 4sp, ADI Instruments社製）後、コンピュータに取り込んだ（sampling rate 3KHz, iBook）。同時に、増幅信号をオシロスコープでモニタしながらウィンドー・ディスクリミネータ（ダイヤメディカル社製DSE-435）によりノイズ成分と神経信号成分を分離し、スパイクカウンタ（Spike Counter、ダイヤメディカル社製DSE-335P）で5秒積算後、チャートレコーダ（日本光電製WT-465G）で記録した。スパイク波形の解析は、SHEソフトウェア（ADI Instruments社製）を用いた。

#### 【0064】

結果を図 3 に示す。胃内および十二指腸内にMSG 150mMを投与した時の迷走神経胃枝（図 3 A）および腹腔枝（図 3 B）の求心活動は亢進した。迷走神経求心

路は内臓感覚、特に、胃および腸からの栄養情報を延髄孤束核に送り込み、満足感、不快感などの食後感覚、及び迷走神経遠心路調節による消化調節を行うシグナル伝導路と考えられている。したがって、MSGの消化管内投与により迷走神経求心路活動が亢進したことは、MSGがそのシグナル発生要因であり、消化管内腔に発現しているmGluR4変異体が、そのシグナル発生を仲介している可能性を示している。

#### 【0 0 6 5】

##### 【発明の効果】

本発明により、新規な代謝型グルタミン酸受容体が提供される。本グルタミン酸受容体は、グルタミン酸のアゴニストもしくはアンタゴニスト又はアロステリックモジュレーターの探索に用いることができる。また、小腸、大腸等の消化管における代謝異常による疾患、症状を改善する医薬として用いることができる。

#### 【0 0 6 6】

##### 【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> 新規グルタミン酸受容体とその利用

<130> P-9163

<140>

<141> 2001-10-23

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

#### 【0 0 6 7】

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 1

gaagttgacg ttcctgatgt act

23

【 0 0 6 8 】

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 2

acagcgtaa tcacgaactg cac

23

【 0 0 6 9 】

<210> 3

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 3

ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtaacaacgc agagt

45

【 0 0 7 0 】

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 4

ctaatacgac tcactatagg gc

22

【 0 0 7 1 】

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 5

aagcagtggg aacaacgcag agt

23

【 0 0 7 2 】

<210> 6

<211> 1755

<212> DNA

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1755)

&lt;400&gt; 6

```

atg cca ggg gta tca tca tct ttg cca acg agg atg aca tca ggg ttc 48
Met Pro Gly Val Ser Ser Ser Leu Pro Thr Arg Met Thr Ser Gly Phe
    1             5             10             15
gac cga tac ttc tcc agc cgc acg ctg gac aac aac agg cgc aac atc 96
Asp Arg Tyr Phe Ser Ser Arg Thr Leu Asp Asn Asn Arg Arg Asn Ile
            20             25             30
tgg ttt gcc gag ttc tgg gag gac aac ttc cat tgc aag ttg agc cgc 144
Trp Phe Ala Glu Phe Trp Glu Asp Asn Phe His Cys Lys Leu Ser Arg
            35             40             45
cac gcg ctc aag aag gga agc cac atc aag aag tgc acc aac cga gag 192
His Ala Leu Lys Lys Gly Ser His Ile Lys Lys Cys Thr Asn Arg Glu
            50             55             60
cgc atc ggg cag gac tcg gcc tat gag cag gag ggg aag gtg cag ttc 240
Arg Ile Gly Gln Asp Ser Ala Tyr Glu Gln Glu Gly Lys Val Gln Phe
            65             70             75             80
gtg att gac gct gtg tac gcc atg ggc cac gcg ctg cac gcc atg cac 288
Val Ile Asp Ala Val Tyr Ala Met Gly His Ala Leu His Ala Met His
            85             90             95
cgt gac ctg tgt ccc ggc cgc gta gga ctc tgc cct cgc atg gac ccc 336
Arg Asp Leu Cys Pro Gly Arg Val Gly Leu Cys Pro Arg Met Asp Pro
            100            105            110
gtg gat ggc acc cag ctg ctt aag tac atc agg aac gtc aac ttc tca 384

```

Val	Asp	Gly	Thr	Gln	Leu	Leu	Lys	Tyr	Ile	Arg	Asn	Val	Asn	Phe	Ser	
		115					120					125				
ggc	att	gcg	ggg	aac	cct	gta	acc	ttc	aat	gag	aac	gga	gac	gca	ccg	432
Gly	Ile	Ala	Gly	Asn	Pro	Val	Thr	Phe	Asn	Glu	Asn	Gly	Asp	Ala	Pro	
		130					135					140				
ggg	cgc	tac	gac	atc	tac	cag	tac	caa	ctg	cgc	aat	ggc	tcg	gcc	gag	480
Gly	Arg	Tyr	Asp	Ile	Tyr	Gln	Tyr	Gln	Leu	Arg	Asn	Gly	Ser	Ala	Glu	
		145					150					155			160	
tac	aag	gtc	atc	ggc	tcg	tgg	aca	gac	cac	ctg	cac	ctc	aga	ata	gag	528
Tyr	Lys	Val	Ile	Gly	Ser	Trp	Thr	Asp	His	Leu	His	Leu	Arg	Ile	Glu	
				165						170					175	
cgg	atg	cag	tgg	cca	ggg	agt	ggc	cag	cag	ctg	ccg	cgc	tcc	atc	tgc	576
Arg	Met	Gln	Trp	Pro	Gly	Ser	Gly	Gln	Gln	Leu	Pro	Arg	Ser	Ile	Cys	
				180						185					190	
agt	ctg	ccc	tgc	cag	ccc	ggg	gag	cga	aag	aag	act	gtg	aag	ggc	atg	624
Ser	Leu	Pro	Cys	Gln	Pro	Gly	Glu	Arg	Lys	Lys	Thr	Val	Lys	Gly	Met	
				195						200					205	
gct	tgc	tgc	tgg	cac	tgc	gag	ccc	tgc	acc	ggg	tac	cag	tac	caa	gtg	672
Ala	Cys	Cys	Trp	His	Cys	Glu	Pro	Cys	Thr	Gly	Tyr	Gln	Tyr	Gln	Val	
				210						215					220	
gac	cgc	tac	acc	tgt	aag	acc	tgc	ccc	tac	gac	atg	cgg	ccc	aca	gag	720
Asp	Arg	Tyr	Thr	Cys	Lys	Thr	Cys	Pro	Tyr	Asp	Met	Arg	Pro	Thr	Glu	
				225						230					235	240
aac	cgc	acg	agc	tgc	cag	ccc	atc	ccc	atc	gtc	aag	ttg	gag	tgg	gac	768
Asn	Arg	Thr	Ser	Cys	Gln	Pro	Ile	Pro	Ile	Val	Lys	Leu	Glu	Trp	Asp	
					245					250					255	
tcg	ccg	tgg	gcc	gtg	ctg	ccc	ctc	ttc	ctg	gcc	gtg	gtg	ggc	atc	gcc	816
Ser	Pro	Trp	Ala	Val	Leu	Pro	Leu	Phe	Leu	Ala	Val	Val	Gly	Ile	Ala	
				260						265					270	

gcc acg ctg ttc gtg gtg gtc acg ttt gtg cgc tac aac gat acc ccc 864  
Ala Thr Leu Phe Val Val Val Thr Phe Val Arg Tyr Asn Asp Thr Pro  
275 280 285

atc gtc aag gcc tcg ggc cgg gaa ctg agc tac gtg ctg ctg gcg ggc 912  
Ile Val Lys Ala Ser Gly Arg Glu Leu Ser Tyr Val Leu Leu Ala Gly  
290 295 300

atc ttt ctg tgc tac gcc act acc ttc ctc atg atc gca gag ccg gac 960  
Ile Phe Leu Cys Tyr Ala Thr Thr Phe Leu Met Ile Ala Glu Pro Asp  
305 310 315 320

ctg ggg acc tgt tcg ctc cgc cgc atc ttc cta ggg ctc ggc atg agc 1008  
Leu Gly Thr Cys Ser Leu Arg Arg Ile Phe Leu Gly Leu Gly Met Ser  
325 330 335

atc agc tac gcg gcc ctg ctg acc aag acc aac cgc att tac cgc atc 1056  
Ile Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr Lys Thr Asn Arg Ile Tyr Arg Ile  
340 345 350

ttt gag cag ggc aaa cgg tcg gtc agt gcc ccg cgt ttc atc agc ccg 1104  
Phe Glu Gln Gly Lys Arg Ser Val Ser Ala Pro Arg Phe Ile Ser Pro  
355 360 365

gcc tcg cag ctg gcc atc acc ttc atc ctc atc tcc ctg cag ctg ctc 1152  
Ala Ser Gln Leu Ala Ile Thr Phe Ile Leu Ile Ser Leu Gln Leu Leu  
370 375 380

ggc atc tgc gtg tgg ttc gtg gtg gac ccc tcc cac tcg gtg gtg gac 1200  
Gly Ile Cys Val Trp Phe Val Val Asp Pro Ser His Ser Val Val Asp  
385 390 395 400

ttc cag gac caa cgg aca ctt gac ccc cgc ttt gcc agg ggc gtg ctc 1248  
Phe Gln Asp Gln Arg Thr Leu Asp Pro Arg Phe Ala Arg Gly Val Leu  
405 410 415

aag tgc gac atc tcg gac ctg tcc ctc atc tgc ctg ctg ggc tac agc 1296  
Lys Cys Asp Ile Ser Asp Leu Ser Leu Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Ser



420	425	430	
atg ctg ctg atg gtc acg tgt act gtg tac gcc atc aag acc cga ggc	1344		
Met Leu Leu Met Val Thr Cys Thr Val Tyr Ala Ile Lys Thr Arg Gly			
435	440	445	
gtg ccc gag acc ttc aac gag gcc aag ccc atc ggc ttc acc atg tac	1392		
Val Pro Glu Thr Phe Asn Glu Ala Lys Pro Ile Gly Phe Thr Met Tyr			
450	455	460	
acc acc tgc att gtc tgg ctg gcc ttc atc ccc atc ttt ttt ggc acc	1440		
Thr Thr Cys Ile Val Trp Leu Ala Phe Ile Pro Ile Phe Phe Gly Thr			
465	470	475	480
tca cag tca gcc gac aag ctg tac atc cag aca acc aca ctg acg gtc	1488		
Ser Gln Ser Ala Asp Lys Leu Tyr Ile Gln Thr Thr Thr Leu Thr Val			
485	490	495	
tcc gtg agt ctg agc gct tca gtg tcc ctg ggg atg ctc tac atg ccc	1536		
Ser Val Ser Leu Ser Ala Ser Val Ser Leu Gly Met Leu Tyr Met Pro			
500	505	510	
aaa gtc tac atc atc ctc ttc cac ccg gag cag aac gtg ccc aag cgc	1584		
Lys Val Tyr Ile Ile Leu Phe His Pro Glu Gln Asn Val Pro Lys Arg			
515	520	525	
aag cgc agt ctc aaa gcc gtg gtc acc gcc gcc acc atg tcc aac aag	1632		
Lys Arg Ser Leu Lys Ala Val Val Thr Ala Ala Thr Met Ser Asn Lys			
530	535	540	
ttc aca cag aag ggc aac ttc agg ccc aat ggg gaa gcc aaa tca gag	1680		
Phe Thr Gln Lys Gly Asn Phe Arg Pro Asn Gly Glu Ala Lys Ser Glu			
545	550	555	560
ctg tgt gag aac ctg gag acc cca gcg ctg gct acc aaa cag acc tac	1728		
Leu Cys Glu Asn Leu Glu Thr Pro Ala Leu Ala Thr Lys Gln Thr Tyr			
565	570	575	
gtc acc tac acc aac cat gcc atc tag	1755		

Val Thr Tyr Thr Asn His Ala Ile

580

585

【 0 0 7 3 】

<210> 7

<211> 584

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 7

Met Pro Gly Val Ser Ser Ser Leu Pro Thr Arg Met Thr Ser Gly Phe

1

5

10

15

Asp Arg Tyr Phe Ser Ser Arg Thr Leu Asp Asn Asn Arg Arg Asn Ile

20

25

30

Trp Phe Ala Glu Phe Trp Glu Asp Asn Phe His Cys Lys Leu Ser Arg

35

40

45

His Ala Leu Lys Lys Gly Ser His Ile Lys Lys Cys Thr Asn Arg Glu

50

55

60

Arg Ile Gly Gln Asp Ser Ala Tyr Glu Gln Glu Gly Lys Val Gln Phe

65

70

75

80

Val Ile Asp Ala Val Tyr Ala Met Gly His Ala Leu His Ala Met His

85

90

95

Arg Asp Leu Cys Pro Gly Arg Val Gly Leu Cys Pro Arg Met Asp Pro

100

105

110

Val Asp Gly Thr Gln Leu Leu Lys Tyr Ile Arg Asn Val Asn Phe Ser

115

120

125

Gly Ile Ala Gly Asn Pro Val Thr Phe Asn Glu Asn Gly Asp Ala Pro

130

135

140

Gly Arg Tyr Asp Ile Tyr Gln Tyr Gln Leu Arg Asn Gly Ser Ala Glu

145

150

155

160

Tyr Lys Val Ile Gly Ser Trp Thr Asp His Leu His Leu Arg Ile Glu  
 165 170 175  
 Arg Met Gln Trp Pro Gly Ser Gly Gln Gln Leu Pro Arg Ser Ile Cys  
 180 185 190  
 Ser Leu Pro Cys Gln Pro Gly Glu Arg Lys Lys Thr Val Lys Gly Met  
 195 200 205  
 Ala Cys Cys Trp His Cys Glu Pro Cys Thr Gly Tyr Gln Tyr Gln Val  
 210 215 220  
 Asp Arg Tyr Thr Cys Lys Thr Cys Pro Tyr Asp Met Arg Pro Thr Glu  
 225 230 235 240  
 Asn Arg Thr Ser Cys Gln Pro Ile Pro Ile Val Lys Leu Glu Trp Asp  
 245 250 255  
 Ser Pro Trp Ala Val Leu Pro Leu Phe Leu Ala Val Val Gly Ile Ala  
 260 265 270  
 Ala Thr Leu Phe Val Val Val Thr Phe Val Arg Tyr Asn Asp Thr Pro  
 275 280 285  
 Ile Val Lys Ala Ser Gly Arg Glu Leu Ser Tyr Val Leu Leu Ala Gly  
 290 295 300  
 Ile Phe Leu Cys Tyr Ala Thr Thr Phe Leu Met Ile Ala Glu Pro Asp  
 305 310 315 320  
 Leu Gly Thr Cys Ser Leu Arg Arg Ile Phe Leu Gly Leu Gly Met Ser  
 325 330 335  
 Ile Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr Lys Thr Asn Arg Ile Tyr Arg Ile  
 340 345 350  
 Phe Glu Gln Gly Lys Arg Ser Val Ser Ala Pro Arg Phe Ile Ser Pro  
 355 360 365  
 Ala Ser Gln Leu Ala Ile Thr Phe Ile Leu Ile Ser Leu Gln Leu Leu  
 370 375 380  
 Gly Ile Cys Val Trp Phe Val Val Asp Pro Ser His Ser Val Val Asp

385                      390                      395                      400  
Phe Gln Asp Gln Arg Thr Leu Asp Pro Arg Phe Ala Arg Gly Val Leu  
                         405                      410                      415  
Lys Cys Asp Ile Ser Asp Leu Ser Leu Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Ser  
                         420                      425                      430  
Met Leu Leu Met Val Thr Cys Thr Val Tyr Ala Ile Lys Thr Arg Gly  
                         435                      440                      445  
Val Pro Glu Thr Phe Asn Glu Ala Lys Pro Ile Gly Phe Thr Met Tyr  
                         450                      455                      460  
Thr Thr Cys Ile Val Trp Leu Ala Phe Ile Pro Ile Phe Phe Gly Thr  
465                      470                      475                      480  
Ser Gln Ser Ala Asp Lys Leu Tyr Ile Gln Thr Thr Thr Leu Thr Val  
                         485                      490                      495  
Ser Val Ser Leu Ser Ala Ser Val Ser Leu Gly Met Leu Tyr Met Pro  
                         500                      505                      510  
Lys Val Tyr Ile Ile Leu Phe His Pro Glu Gln Asn Val Pro Lys Arg  
                         515                      520                      525  
Lys Arg Ser Leu Lys Ala Val Val Thr Ala Ala Thr Met Ser Asn Lys  
                         530                      535                      540  
Phe Thr Gln Lys Gly Asn Phe Arg Pro Asn Gly Glu Ala Lys Ser Glu  
545                      550                      555                      560  
Leu Cys Glu Asn Leu Glu Thr Pro Ala Leu Ala Thr Lys Gln Thr Tyr  
                         565                      570                      575  
Val Thr Tyr Thr Asn His Ala Ile  
                         580

【 0 0 7 4 】

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 8

Met Pro Gly Val Ser Ser Ser Leu Pro Thr Arg Met Thr Ser

1 5 10

【図面の簡単な説明】

【図 1】 mGluR4 及び mGluR4 変異体の構造の概要を示す図。

【図 2】 抗 mGluR4 抗体による免疫染色の結果を示す図。(A) 胃体部。(B) 幽門部。

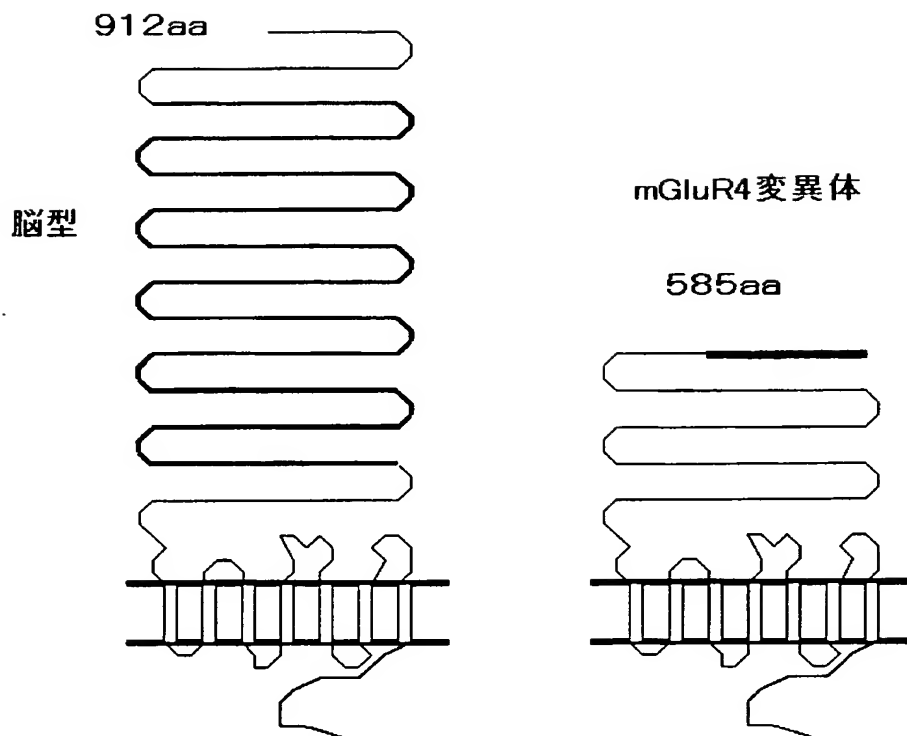
【図 3】 神経活動に対する L-グルタミン酸の作用を示す図。横軸は時間。縦軸は神経活動を表す。

(A) 迷走神経胃枝求心性神経活動に対するグルタミン酸の作用を示す図。

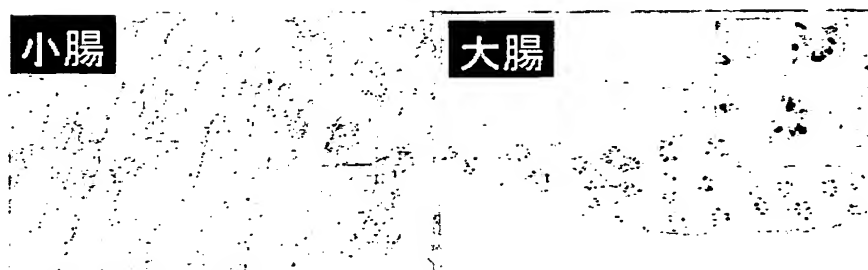
(B) 迷走神経腹腔枝求心性神経活動に対するグルタミン酸の作用を示す図

【書類名】 図面

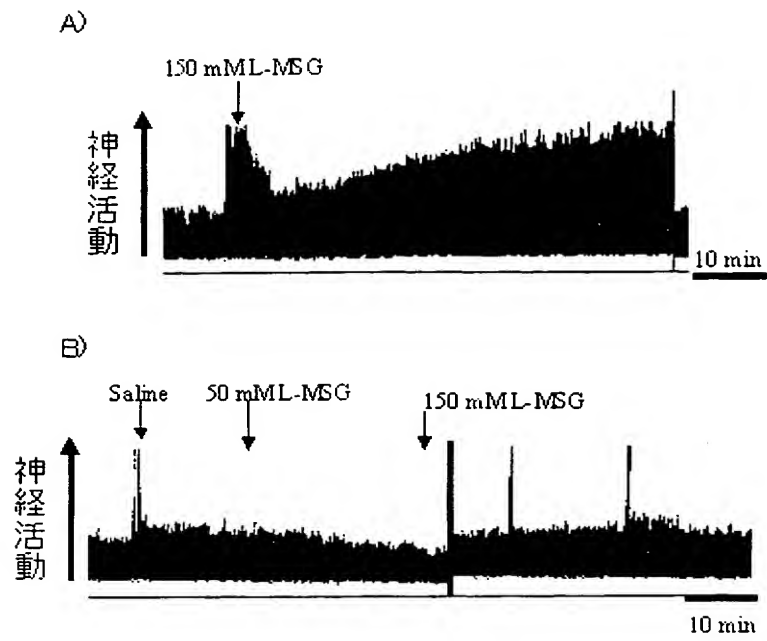
【図1】



【図2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 消化管グルタミン酸センサーの実体を明らかにし、それを利用した技術を提供する。

【解決手段】 下記性質を有するグルタミン酸受容体タンパク質とこれに結合する物質とを被検物質の存在下で反応させ、該反応の阻害又は促進を検出することにより、グルタミン酸のアゴニストもしくはアンタゴニスト又はアロステリックモジュレーターを探索する：

(A) タイプ 4 型代謝型グルタミン酸受容体タンパク質と共通の膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインを有する、

(B) タイプ 4 型代謝型グルタミン酸受容体タンパク質よりも約 3 1 6 又は 3 2 7 アミノ酸残基短い細胞外ドメインを有する。

【選択図】 図 1



特願 2 0 0 1 - 3 2 5 1 5 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 0 0 6 6 ]

1. 変更年月日 1 9 9 1 年 7 月 2 日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区京橋 1 丁目 1 5 番 1 号

氏 名 味の素株式会社